Über die Einführung der Phosphorsäure in Kohlenhydrate und Glycerin

Über p-Kresolätherschwefelsäure und p-Kresolglucuronsäure

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

genehmigt

von der Philosophischen Fakultät

der

Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

ACAD
LIBRARY
BERL.

Von

Erich Kretschmer
aus Lissa i. P.

Tag der Promotion: 12. August 1911.

Verlagsbuchhandlung von Julius Springer in Berlin.
1911.

319

Referenten: Professor Dr. S. Gabriel
Professor Dr. W. Nernst.

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Meinen lieben Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535712_0073

Organische Abkömmlinge der Phosphorsäure spielen in der Natur eine große Rolle, gehört doch der Phosphor zu den wenigen Elementen, die in organischer Bindung mit den wichtigsten Bausteinen der Lebewesen auftreten. Phosphorhaltige Eiweißkörper (vom Typus des Vitellins und Caseins), phosphorhaltige Kohlenhydrate (vom Typus der Nucleinsäuren), phosphorhaltige Fette (vom Typus der großen Klasse der Phosphatide bzw. Lecithine) sind bekannt, d. h. lauter Substanzen, die mit der Struktur und dem Stoffwechsel der lebenden Zelle aufs engste verknüpft sind.

Ein Aufbau solcher Produkte ist bisher nur in beschränktem Maße möglich gewesen. Die das Grundskelett der Lecithine bildende Glycerinphosphorsäure ist — wenigstens in der racemischen Form — von Tuttin und Hann[1]) synthetisch dargestellt worden.

Die künstliche Einfügung des Phosphors in Eiweißkörper unter Bildung caseinartiger Substanzen ist vor kurzem C. Neuberg und H. Pollak[2]) gelungen.

Dieselben Autoren haben auch die ersten Synthesen von Kohlenhydratphosphorsäureestern ausgeführt, indem sie die Saccharose- und Glucosephosphorsäure dargestellt haben[3]).

---

[1]) F. Tuttin und A. C. O. Hann, Journ. chem. Soc. 87, 249, 1905; 89, 1749, 1906.

[2]) C. Neuberg und H. Pollak, Biochem. Zeitschr. 26, 529, 1910.

[3]) C. Neuberg und H. Pollak, Biochem. Zeitschr. 23, 515, 1910; 26, 514, 1910; Ber. d. Dtsch. chem. Ges. 43, 2060, 1910.

Die weitere Erforschung dieser Kohlenhydratphosphorsäureester bietet deshalb Interesse, weil solche Verbindungen außer in den Nucleinsäuren auch im intermediären Stoffwechsel auftreten. So ist ihre Bedeutung für den Stoffwechsel der Hefe und ihre Rolle bei der alkoholischen Gärung beispielsweise klargelegt.

A. Harden und W. J. Young[1]), E. Buchner und Antoni[2]), L. Iwanoff[3]) und A. v. Lebedeff[4]) zeigten, daß Alkaliphosphate als sogenanntes Koenzym der Zymase fungieren, indem sie unter Bildung einer Hexosephosphorsäure in den Gärprozeß vorübergehend eintreten. Nach A. Wohl[5]) wirkt hierbei die Phosphorsäure wie ein wasserentziehendes Mittel, das den Zerfall der Zuckermoleküle in kleinere Alkohol liefernde Reste einleitet.

Auch für den Vorgang der sogenannten Glykolyse scheinen, wenigstens nach Versuchen von W. Löb[6]) im Reagensglase, die Phosphorsäure bzw. lösliche Phosphate von Bedeutung zu sein.

Unter den Stoffwechselendprodukten der Hefe, d. h. in vergorenen Zuckerlösungen, treten Kohlenhydratphosphorsäureester auf[7]). Ganz allgemein scheinen diese Verbindungen beim Atmungsprozeß eine Rolle zu spielen.

Bei den durch Hefepreßsaft erzeugten Phosphorsäureestern handelt es sich nach Harden und Young[8]) um die d-Lävulosediphosphorsäure.

Die Natur der in den Nucleinsäuren vorkommenden Hexosephosphorsäure ist unbekannt.

---

[1]) A. Harden und W. J. Young, Proc. chem. Soc. 21, 189, 1905; Biochem. Zeitschr. 32, 1911.

[2]) E. Buchner, Biochem. Zeitschr. 19, 191, 1909.

[3]) L. Iwanoff, Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 281, 1907.

[4]) A. v. Lebedeff, Biochem. Zeitschr. 20, 114, 1909.

[5]) A. Wohl, Biochem. Zeitschr. 5, 44, 1901.

[6]) W. Löb, Biochem: Zeitschr. 32, 43, 1911.

[7]) C. Neuberg, Biochem. Zeitschr. 24, 430, 1910.

[8]) A. Harden und W. J. Young, Biochem. Zeitschr. 32, 173 u. 177, 1911.

Dagegen sind aus den Gehirn- und Organlipoiden mehrere Substanzen dargestellt worden, denen eine Galaktosephosphorsäure zugrunde liegt, so das Sphingomyelin von Thudichum[1]), die Cerebriniphosphorsäure von A. Bethe[2]) und namentlich das Carnaubon der Niere von E. K. Dunham und C. A. Jacobson[3]).

Deshalb war in erster Linie die Darstellung einer d-Galaktosephosphorsäure auf dem Wege der Synthese wünschenswert. Dieselbe wird im folgenden beschrieben.

Die Methode der Gewinnung schließt sich an die früher von Neuberg und Pollak (l. c.) befolgte an und besteht in der Einwirkung von Phosphoroxychlorid auf die wässerige Lösung des Zuckers bei Gegenwart eines säurebindenden Mittels.

An sich sind die Kohlenhydrate als Polyhydroxylverbindungen befähigt, mehrere Phosphorsäurereste aufzunehmen; um jedoch die Verhältnisse nicht zu komplizieren, wurde die Reaktion so geleitet, daß sie zur Bildung eines Monophosphorsäureesters führte.

Es kam Phosphoroxychlorid stets auf überschüssigen Zucker zur Anwendung. Als säurebindendes Mittel hat sich bei reduzierenden Zuckern das kohlensaure Calcium bewährt, das ohne Einwirkung auf das Kohlenhydrat selbst ist und das die bei der Umsetzung (infolge Zersetzung des Phosphoroxychlorids) auftretende freie Salzsäure sowie Phosphorsäure aufnimmt. Die Phosphorsäure wird dabei als unlösliches Tricalciumphosphat gefällt, die Salzsäure in Calciumchlorid übergeführt, das von dem entstandenen kohlenhydratphosphorsauren Calcium mittels Alkohol getrennt werden kann. Die Umsetzung geht nach folgender Gleichung vor sich:

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,POCl_3 + 5\,CaCO_3 = H_2O + 5\,CO_2 + 3\,CaCl_2 + 2\,C_6H_{11}O_5 \cdot O \cdot PO_3Ca.$$

---

[1]) Thudichum, Tübingen 1901.

[2]) A. Bethe, Arch. f. experim. Pathol. und Pharmakol. 48, 73.

[3]) E. K. Dunham und C. A. Jacobson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 302, 1910.

Nach diesem Verfahren wurde die Galaktosephosphosäure in reinem Zustande erhalten.

Auch andere Zucker lassen sich auf diese Weise phosphorylieren, so die Fructose, der Milchzucker und die Maltose. In allen diesen Fällen konnte die reichliche Bildung der organischen Kohlenhydratphosphorsäuren nachgewiesen werden. Allein die Reindarstellung scheiterte hier an der Unmöglichkeit, das Chlorcalcium zu entfernen. Denn fällte man die konzentrierte wässerige Lösung, die nur noch unveränderten Zucker, kohlenhydratphosphorsauren Kalk und Calciumphosphat enthielt, mit absolutem Alkohol, so erwies sich der Niederschlag stets als stark chlorhaltig. Offenbar handelt es sich um Doppelverbindungen der kohlenhydratphosphorsauren Salze mit Erdalkalihalogeniden analog den bekannten Verbindungen der gewöhnlichen Zucker mit Halogensalzen.

So nähert sich die durch Phosphorylierung des Fruchtzuckers erhaltene Verbindung der Zusammensetzung:

$$2\,C_6H_{11}O_9PCa + CaCl_2 + 5\,H_2O.$$

Auch in den Aminozucker Glucosamin läßt sich auf diese Weise Phosphorsäure einführen.

Auf einem Umwege gelang die Darstellung von Fructosephosphorsäure, und zwar durch partielle Hydrolyse des Rohrzuckerphosphorsäureesters. Der letztere ist von Neuberg und Pollak[1]) durch Phosphorylierung des Rohrzuckers bei Gegenwart von Ätzkalk dargestellt worden und bildet sich nach der Gleichung:

$$2\,C_{12}H_{22}O_{11} + 2\,POCl_3 + 5\,CaO = H_2O + 3\,CaCl_2 + 2\,C_{12}H_{21}O_{10}\cdot O\cdot PO_3Ca.$$

Das leicht erhältliche Kalksalz stellt in reinem Zustande ein luftbeständiges, farbloses, in Wasser spielend leicht lösliches Pulver dar von der Zusammensetzung:

$$C_{12}H_{21}O_{14}PCa + 2\,H_2O,$$

[1]) l. c.

das nicht reduziert, nicht gärt und auch keine Reaktion auf anorganische Phosphorsäure gibt. Bei der festen Bindung der Phosphorsäure an das Zuckermolekül läßt sich die Hydrolyse nun so leiten, daß die acetalartige Verknüpfung zwischen Glucose- und Fruchtzuckerrest rascher aufgehoben wird, als die Hydrolyse des Phosphorsäureesters eintritt.

Die Spaltung läßt sich durch verdünnte Salzsäure ausführen. Dabei tritt sehr schnell Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Lösung, aber eine relativ unbedeutende Abspaltung von Phosphorsäure ein. Schafft man die letztere durch Schütteln mit kohlensaurem Kalk fort, so wird durch Alkohol aus der Lösung fructosephosphorsaures Calcium ausgefällt. Dasselbe hat die Zusammensetzung:

$$C_6H_{11}O_5 \cdot O \cdot PO_3Ca + H_2O.$$

Es reduziert stark beim Erwärmen Fehlingsche Mischung, gibt die Probe von Seliwanoff und gärt mit Bierhefe zum Unterschiede von Saccharosephosphorsäure und Glucosephosphorsäure sehr stark.

Von Erfolg war auch die Phosphorylierung des Glycerins begleitet, die sich in genau der gleichen Weise durch Schütteln einer wässerigen Glycerinlösung mit Phosphoroxychlorid ausführen läßt.

Die Reaktion vollzieht sich hier nach der Gleichung:

$$2\,C_3H_5(OH)_3 + 2\,POCl_3 + 5\,CaCO_3 = 5\,CO_2 + H_2O + 3\,CaCl_2 + 2\,C_3H_5(OH)_2 \cdot O \cdot PO_3Ca.$$

In diesem Falle geht die Umsetzung ziemlich glatt vor sich, und auch die Isolierung bietet keine Schwierigkeiten, doch hat das Verfahren keine Vorteile vor der längst bekannten Synthese der Glycerinphosphorsäure aus Glycerin und Phosphorsäureanhydrid.

Auch bei einer zyklischen Hydroxylverbindung, dem Inosit, läßt sich durch Phosphorylierung Esterbildung erreichen, wenn man die Verbindung bei Gegenwart von Soda mit Phosphoroxychlorid schütttelt. Es entsteht in reichlicher Menge ein Inositpolyphosphorsäureester. Die Entfernung des Halogens

bildet hier keine Schwierigkeiten, da dieser Inositester gleich dem natürlich vorkommenden Phytin ein in Wasser unlösliches Kalksalz bildet und sich demgemäß mit Calciumchlorid ausfällen läßt.

Allein die Trennung von beigemischtem Calciumphosphat ist nach keiner der für diesen Zweck angegebenen Methoden von A. Contardi[1]), W. Vorbrodt[2]) oder E. Starkenstein[3]) gelungen.

Experimenteller Teil.

d-Galaktosephosphorsäure.

$C_6H_{13}O_9P$.

60 g durch Umkrystallisieren gereinigte Galaktose wurden in 1500 ccm Wasser gelöst, in dem 160 g kohlensaurer Kalk suspendiert waren. Da sich beim Zutröpfeln von Phosphoroxychlorid Kohlensäure entwickelt, ist die Benutzung von Schüttelgefäßen auch wegen der gleichzeitig notwendigen Eiskühlung unbequem. Daher wurde die von Neuberg und Pollak ursprünglich benutzte Methode verlassen und an ihrer statt in offenen Gefäßen gearbeitet. Die notwendige Durchmischung kann nämlich ebenso wirksam durch einen kräftigen Rührer erfolgen. Es wurden daher unter lebhaftem Turbinieren zu obigem Gemisch, das sich in einem mit Eiskochsalzmischung umgebenen Filtrierstutzen befand, langsam 50 g Phosphoroxychlorid, gelöst in ca. 100 ccm Chloroform, aus einem mit Chlorcalciumrohr versehenen Scheidetrichter tropfen gelassen. Diese Prozedur erforderte ca. 6 Stunden. Die Mischung blieb dann 12 Stunden sich selbst überlassen. Durch diese Arbeitsweise vermeidet man, daß jemals saure Reaktion auftritt. Dann wurde von dem aus Calciumcarbonat sowie Calciumphosphat bestehenden Schlamm abgesaugt, der Rückstand gut ausgewaschen und das wasserklare Filtrat (nach Abtrennen von etwas Chloroform im

---

[1]) A. Contardi, Rendiconti delle R. Academia dei Lincei 19, Serie 5a, 23, 1910.

[2]) W. Vorbrodt, Bull. de l'Acad. in Krakau 1910, 414.

[3]) E. Starkenstein, Biochem. Zeitschr. 30, 56, 1910.

Scheidetricher) im Vakuum bis zum ganz dünnen Sirup bei 40° eingeengt.

Dabei schied sich als Bicarbonat gelöst gewesenes Calciumcarbonat sowie durch Zersetzung entstandenes Calciumphosphat ab. Die filtrierte Flüssigkeit wurde in ungefähr 1 l absoluten Alkohol unter dauerndem Rühren eingetropft. Dabei fiel das galaktosephosphorsaure Calcium in groben Flocken aus, die nach 24stündigem Stehen abgesaugt und durch Trocknen im Vakuumexsiccator von anhaftendem Alkohol befreit wurden.

Da die Verbindung noch Calciumchlorid einschloß, wurde sie abermals in Wasser gelöst, mit Alkohol gefällt und dieser Behandlung noch so oft unterworfen, bis die Halogenreaktion verschwunden war. Hierbei schrumpft naturgemäß die anfangs nicht unbeträchtliche Menge zusammen.

Das galaktosephosphorsaure Calcium bildet ein lockeres weißes Pulver, das, frisch gefällt, in Wasser leicht löslich ist. Nach dem Trocknen bis zur Gewichtskonstanz jedoch ist es nur zum Teil löslich. Die frisch bereitete Lösung reduziert heiße Fehlingsche Mischung intensiv und gibt keine Reaktion mit Magnesiamixtur und Ammoniummolybdat. Erst nach mehrfachem Abrauchen mit Salpetersäure bzw. nach Veraschen kann man die Reaktion auf anorganische Phosphorsäure erhalten. Mit Bierhefe trat kräftige Gärung ein, die intensiver zu verlaufen schien als die bekannte träge Gärung der freien Galaktose. Es handelt sich hier wohl um eine Aktivierung des Gärprozesses durch die organische Phosphorsäureverbindung im Sinne von Harden und Young.

Bei 110° zur Gewichtskonstanz getrocknet, verliert die vakuumtrockene Substanz ein Molekül Wasser.

Die Analyse ergab folgende Werte:

0,2014 g verloren bei 110° 0,0142 g H_2O,
0,1742 „ gaben 0,1427 g CO_2 und 0,0660 g H_2O,
0,1300 „ „ 0,0520 „ Asche,
0,1300 „ „ 0,0600 „ $CaSO_4$ (= 0,0176 g Ca) und 0,0475 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0132 g P).

Berechnet für $C_6H_{11}O_9PCa + H_2O$		Gefunden
$Ca_2P_2O_7$	= 40,18 %	40,00 %
Ca	= 12,65 „	12,75 „
P	= 9,81 „	9,57 „
C	= 22,79 „	22,34 „
H	= 4,11 „	4,23 „
H_2O	= 5,69 „	7,05 „

d-Fructosephosphorsäure.

90 g Lävulose wurden in der für die Darstellung der Galaktosephosphorsäure beschriebenen Art mit jeweils wechselnden Mengen Phosphoroxychlorid behandelt. Wie schon in der Einleitung erwähnt, bietet die Abtrennung der Phosphorsäure als Kalksalz keinerlei Schwierigkeiten. Dagegen haftet der Verbindung hartnäckig Chlor an, das auch durch zahlreiches Umfällen nicht zu beseitigen ist. Der Versuch einer Entfernung mit Silbersulfat scheiterte an der Empfindlichkeit der Fructosephosphorsäure gegen Silbersalze. In einem Falle schied sich nach mehrfachem Umfällen ein dichter Brei von Krystallnadeln ab. Aber auch hier lag eine durch Umkrystallisieren nicht trennbare Doppelverbindung der Lävulosephosphorsäure mit Chlorcalcium vor. Die Aschebestimmung lehrte, daß sich die Zusammensetzung der Formel

$$2C_6H_{11}O_9PCa + CaCl_2 + 5H_2O$$

näherte.

0,2334 g	Substanz	gaben	0,1094 g Asche
0,1129 „	„	„	0,0515 „ „
0,0710 „	„	„	0,0313 „ „

Berechnet für obige Formel Asche	Gefunden
45,81 %	46,88 %
—	45,62 „
—	44,08 „

Bei dieser Sachlage mußte trotz zahlreicher vergeblicher Versuche von einer Reindarstellung der Lävulosephosphorsäure Abstand genommen werden.

Dagegen gelang die Gewinnung einer solchen Verbindung durch partielle Hydrolyse der Rohrzuckerphosphorsäure.

Zu diesem Zwecke wurden 5 g des nach den Angaben von Neuberg und Pollak[1]) dargestellten Calciumsalzes in 100 ccm Wasser gelöst und mit 10 ccm Salzsäure (D = 1,12) versetzt. Die Mischung wurde dann 15 Minuten auf dem Wasserbade erhitzt. Dabei färbte sie sich bräunlich durch Bildung von Huminstoffen, reduzierte stark Fehlingsche Lösung und gab bereits eine Reaktion auf anorganische Phosphorsäure. Sie wurde noch warm mit überschüssigem Calciumcarbonat versetzt und nach dem Aufhören der Kohlensäureentwicklung filtriert. Durch diese Behandlung war abgespaltene Phosphorsäure als unlösliches Calciumphosphat wieder entfernt und gleichzeitig Entfärbung der Flüssigkeit bis zu lichtem Hellgelb bewirkt worden. Die Lösung wurde alsdann im Vakuum bei 40° eingeengt und in eine reichliche Menge absoluten Alkohols eingetropft. Es fiel ein weißes Kalksalz aus, das durch erneute Lösung und abermalige Alkoholfällung von Chlorcalcium befreit wurde. Das Calciumsalz gab keine Reaktion auf anorganische Phosphorsäure, enthielt aber nach dem Veraschen nachweisbaren Phosphor. Die Probe von Seliwanoff fiel positiv aus. Gegen Fehlingsche Mischung zeigte die Substanz starkes Reduktionsvermögen beim Erwärmen. Durch Bierhefe wurde sie in lebhafte Gärung versetzt.

0,0646 g Substanz gaben 0,0261 g Asche,
0,0646 „ „ „ 0,0287 „ $CaSO_4$ (= 0,0086 g Ca),
0,0702 „ „ „ 0,0254 „ $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0071 g P).

	Berechnet für $C_6H_{11}O_9PCa + H_2O$	Gefunden
$Ca_2P_2O_7$	= 40,18 %	40,40 %
Ca	= 12,65 „	13,31 „
P	= 9,81 „	10,07 „

[1]) l. c.

Die Hydrolyse der Saccharosephosphorsäure läßt sich statt durch Salzsäure auch durch Phosphorsäure bewirken. Dabei bleibt die Lösung farblos, und durch Calciumcarbonat kann man leicht die anorganische Phosphorsäure wieder entfernen. Aber bei Anwendung der Phosphorsäure ist der Unterschied in der Schnelligkeit für den Zerfall der typischen Rohrzuckerverknüpfung und der Esterbindung an Phosphorsäure geringer, so daß man leicht zu wenig oder zu weitgehend hydrolysierte Produkte erhält.

Glycerinphosphorsäure.

Die Gewinnung von Glycerinphosphorsäure aus Glycerin durch Phosphorylierung mit Phosphoroxychlorid bei Gegenwart von Calciumcarbonat kann in der bei den Zuckern beschriebenen Weise erfolgen. Intensive Kühlung ist hierbei jedoch unnötig.

In Arbeit genommen wurden 46 g Glycerin, 77 g Phosphoroxychlorid, 250 g Calciumcarbonat. Nach beendeter Kohlensäureentwicklung wurde die Flüssigkeit filtriert und der Rückstand der Kalksalze mit kaltem Wasser ausgewaschen. Die gesamte Flüssigkeit wurde dann im Vakuum bei 35 bis 40° eingeengt. Dabei scheidet sich noch etwas Calciumcarbonat, aber kein Calciumphosphat (wie bei den zersetzlicheren Zuckerestern) ab. Die Ausfällung des gebildeten glycerinphosphorsauren Calciums erfolgte mit Aceton, da sie sich mit absolutem Alkohol als unausführbar erwies.

Da Aceton sowohl wasserhaltiges Glycerin wie Calciumchlorid aufnimmt, blieben diese gelöst, während sich das Calciumglycerophosphat als dickes Öl abschied, das durch mehrfaches Dekantieren mit Aceton gewaschen wurde. Die ölige Fällung wurde alsdann mit gewöhnlichem Alkohol aufgekocht, wobei ein flockiges Kalksalz ausfiel. Durch Umfällen aus wässeriger Lösung mit Alkohol wurde daraus ein glycerinphosphorsaures Calcium isoliert, das folgende Zusammensetzung aufwies:

0,0672 g verloren bei 100° 0,0048 g H_2O;
0,0672 g gaben 0,0374 g $Ca_2P_2O_7$,
0,0672 „ „ 0,0401 „ $CaSO_4$ (= 0,0118 g Ca),
0,0672 g „ 0,0329 „ $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0092 g P),
0,1606 „ „ 0,0897 „ CO_2,
0,1606 „ „ 0,0462 „ H_2O.

	Berechnet für $C_3H_7O_6PCa + H_2O$	Gefunden
H_2O	= 7,89 %	7,14 %
$Ca_2P_2O_7$	= 55,70 „	55,66 „
Ca	= 17,60 „	17,58 „
P	= 13,59 „	13,63 „
C	= 15,80 „	15,23 „
H	= 3,09 „	3,21 „

Dieses glycerinphosphorsaure Calcium entwickelte mit Bierhefe reichlich Kohlensäure, wie es von Neuberg und Tir[1]) für die auf dem üblichen Wege dargestellte Verbindung gezeigt worden ist.

---

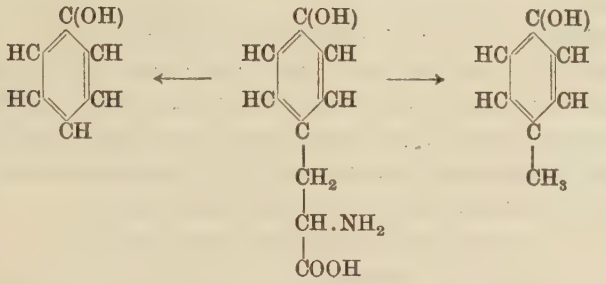
[1]) C. Neuberg und Tir, Biochem. Zeitschr. 32, 323, 1911.

Über p-Kresolätherschwefelsäure und p-Kresolglucuronsäure.

Im Jahre 1852 erhielt Städeler[1]) als erster Phenol bei der Destillation von Urin mit Schwefelsäure. Jedoch erst E. Baumann[2]) erkannte die Muttersubstanz dieses Phenols in der sogenannten Phenolätherschwefelsäure $C_6H_5O.SO_3H$ bzw. in deren Salzen. Daneben kommt schon in der Norm die Phenolglucuronsäure[3])

$$C_6H_5.O.CH(CHOH)_2 - CH - CH.OH - COOH$$
$$\quad\quad\quad

im Darm sowohl zu Kresol wie zu Phenol abgebaut werden kann:



Nach neueren Untersuchungen von W. Mooser[1]) u. a. ist es nun wahrscheinlich geworden, daß die Menge des Phenols im Harn überhaupt weit hinter der des p-Kresols zurücktritt, ja, im Harn der Pflanzenfresser findet sich fast nur p-Kresol, und auch beim normal ernährten Menschen überwiegt letzteres.

Wie erwähnt, sind die Phenole im Urin niemals in freier Form, sondern stets in gebundenem Zustande vorhanden. Für das p-Kresol kommen die p-Kresolätherschwefelsäure und die p-Kresolglucuronsäure in Betracht. Nun ist die alte Lehre E. Baumanns[2]) und O. Schmiedebergs[3]), daß, solange dem Organismus Sulfate zur Verfügung stehen, die Phenole als Ätherschwefelsäure zur Ausscheidung gelangen, durch die Auffindung der Phenolglucuronsäure im normalen Harn widerlegt. Denn dieser ist ja reich an anorganischen Sulfaten. E. Salkowski[4]) sowie A. Falk[5]) fanden, daß nach Phenolgebrauch entleerter Harn bei ganz unzweifelhaftem Gehalt an gewöhnlicher Schwefelsäure überwiegend Phenolglucuronsäure enthalten kann. Nach jüngst von C. Tollens[6]) gemachten Angaben paaren sich die Phenole beim Menschen sogar vorzugsweise mit Glucuronsäure,

---

[1]) W. Mooser, Zeitschr. f. physiol. Chem. 63, 155, 1909.
[2]) E. Baumann, Arch. f. d. ges. Physiol. 13, 299, 1875.
[3]) O. Schmiedeberg, Arch. f. experim. Pathol. 14, 306, 1876.
[4]) E. Salkowski, Zeitsch. f. physiol. Chem. 42, 229, 1907.
[5]) A. Falck, Münch. med. Wochenschr. 1902, 1489.
[6]) C. Tollens, Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 138, 1910.

und für das Kaninchen kam F. Stern[1]) zu einem ähnlichen Resultat.

Während nun die p-Kresolschwefelsäure seit den Untersuchungen E. Baumanns[2]) eine wohlbekannte Substanz ist, hat merkwürdigerweise die mindestens ebenso wichtige p-Kresolglucuronsäure kaum Beachtung gefunden. Wenigstens scheinen Versuche zur Darstellung der reinen p-Kresolglucuronsäure nicht angestellt worden zu sein. Diese Lücke auszufüllen beabsichtigten die im folgenden mitgeteilten Versuche.

Da bei den zu erwartenden Eigenschaften der p-Kresolglucuronsäure eine Darstellung aus normalem Urin aussichtslos erschien, wurde zur Isolierung der Harn zweier Hunde benutzt, die 50 g p-Kresol in Dosen von 1 g täglich mittels Schlundsonde erhalten hatten. Der gesammelte Urin wurde mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade auf ein Volumen von ca. 3 l eingeengt. Der braun gefärbte, von einigen auskrystallisierten Salzen abgegossene Harn wurde mit 100 g in Wasser gelöster krystallisierter Phosphorsäure angesäuert und nach der Methode von E. Külz[3]) 6mal mit einem Gemisch von je 2 Teilen Äther und 1 Teil Alkohol ausgeschüttelt. Da der Rückstand noch immer intensive Reaktion auf gebundene Glucuronsäure gab, so wurden nochmals 50 g Phosphorsäure hinzugefügt und noch weitere 6 Ausschüttelungen vorgenommen.

Die sorgfältig abgetrennten Ätherauszüge wurden durch trockene Filter filtriert und durch Destillation vom Äther befreit. Um jede Zersetzung während der Destillation und der nachfolgenden Verarbeitung zu vermeiden, wurde noch vor dem Übertreiben des Äthers gefälltes Bariumcarbonat in reichlicher Menge hinzugesetzt. Durch eingelegte Holzstäbe läßt sich das Stoßen fast völlig vermeiden. Die Destillationsrückstände wurden alsdann vereint und durch Eindampfen in einer Emailleschale unter Zusatz von etwas Wasser von dem noch vorhandenen Alkohol befreit. Beim Eindampfen schieden sich aus der über-

[1]) F. Stern, Zeitschr. f. physiol. Chem. 68, 52, 1910.
[2]) E. Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 2, 341, 1878.
[3]) E. Külz, Zeitschr. f. Biol. 27, 247, 1890.

schüssiges Bariumcarbonat enthaltenden braunen Lösung dicke Krystallkrusten in reichlicher Menge ab. Nach dem Erkalten erstarrte der Schaleninhalt geradezu zu einem Brei. Die abgeschiedenen Krystalle gaben eine intensive Glucuronsäurereaktion mit Naphthoresorcin nach Tollens. Bei ihrer großen Schwerlöslichkeit wurde die gesamte Kristallmasse mit mehreren Litern Wasser ausgekocht und siedend vom Bariumcarbonat abfiltriert. Beim Eindampfen kristallisierten abermals dicke Krusten aus, deren Menge sich beim Stehen noch vermehrte. Die erhaltenen Kristalle wurden abgesaugt und mit kaltem Wasser ausgewaschen. Sie waren nur noch schwach gelb gefärbt und konnten aus heißem Wasser unter Zusatz einer kleinen Menge Knochenkohle leicht rein erhalten werden.

Die Verbindung bildet perlmutterartig glänzende, weiße Blättchen, die an Cholesterinkrystalle erinnern. Trotz ihrer optischen Aktivität (Linksdrehung) und trotz starken Ausfalls der Glucuronsäurereaktion mit Naphthoresorcin ist diese Verbindung nicht einfach das Bariumsalz der p-Kresolglucuronsäure, sondern sie stellt eine interessante Verbindung der Bariumsalze von p-Kresolglucuronsäure und p-Kresolschwefelsäure zu gleichen Molekülen dar. Noch vor Ausführung der Analysen wurden wir auf diesen Tatbestand durch das Verhalten der Substanz zu verdünnter Salzsäure aufmerksam. Beim Kochen mit HCl stellt sich nämlich, ganz wie bei einer gepaarten Glucuronsäure, intensives Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Lösung ein. Gleichzeitig jedoch scheidet sich aus der Lösung reichlich Bariumsulfat ab, das seine Entstehung nur der Gegenwart einer gepaarten Schwefelsäure verdanken konnte.

Die Analysen ergaben folgendes:

	0,1847 g	Substanz	lieferten	0,2598 g	CO_2
	0,1855 „	„	„	0,2605 „	CO_2
	0,1847 „	„	„	0,0645 „	H_2O
	0,1855 „	„	„	0,0649 „	H_2O
Ba-Bestimmung	0,1513 „	„	„	0,0561 „	$BaSO_4$
	0,1951 „	„	„	0,0725 „	$BaSO_4$
S-Bestimmung	0,1261 „	„	„	0,0458 „	$BaSO_4$
	0,0923 „	„	verloren bei 120°	0,0026 g	H_2O

Eine Verbindung von p-kresolglucuronsaurem Barium mit p-kresolschwefelsaurem Barium von der Formel:

$$(C_{13}H_{15}O_7)_2Ba + (C_7H_7SO_4)_2Ba + 2H_2O = C_{40}H_{44}O_{22}S_2Ba_2 + 2H_2O$$

verlangt:

C	38,46%
H	3,68%
S	5,12%
Ba	21,96%
H_2O	2,88%

Gefunden ist:

C	38,30%, 38,51%
H	3,91%, 3,92%
S	4,98%
Ba	21,87%, 21,82%
H_2O	2,81%

Wie man sieht, stimmen die analytischen Daten so ausgezeichnet, daß kein Zweifel an der Zusammensetzung der Verbindung herrschen kann.

Auch das Verhalten steht mit dieser Formulierung im besten Einklang. Mit Bariumchlorid versetzt bleibt die heiße, wässerige Lösung vollkommen klar. Setzt man nun aber Salzsäure hinzu und erhitzt weiter, so fällt alsbald Bariumsulfat als schwerer Niederschlag zu Boden, und die vorher völlig geruchlose Flüssigkeit riecht stark nach p-Kresol, das an seinen charakteristischen Reaktionen leicht erkannt werden kann. (Proben mit Eisenchlorid, Bromwasser und Millons Reagens.) Die ungespaltene Verbindung reduziert Fehlingsche Lösung[1]) selbst bei längerem Sieden nicht, nach vorheriger Spaltung mit verdünnter Salzsäure jedoch schon bei Zimmertemperatur. Zur Bestimmung der optischen Aktivität wurde die Substanz in heißem Wasser gelöst.

Da sich übersättigte Lösungen bilden, bietet die optische Untersuchung trotz der Schwerlöslichkeit keine Schwierigkeit.

---

[1]) Wegen des Bariumgehaltes aus Kupferacetat bereitet.

0,1013 g Substanz wurden in 10 ccm heißem Wasser gelöst. Nach dem Erkalten wog die Lösung 10,0012 g. Der beobachtete Drehungswinkel war — 0,70°. Daraus berechnet sich

$$[\alpha]_D = -34{,}55°.$$

Eigentümlich ist das Verhalten der Verbindung beim Anstellen der Farbenreaktionen auf Glucuronsäure. Sie gibt glatt und höchst intensiv, wie mehrfach erwähnt, die Probe mit Naphthoresorcin. Die Orcinreaktion fällt dagegen bei der üblichen Art der Anstellung negativ oder nur ganz schwach positiv aus. Erst bei sehr langem Kochen erhält man eine positive Probe. Ähnliches hat bereits E. Salkowski[1]) für die Phenolglucuronsäure beobachtet.

Aber eine andere Farbenreaktion ist erwähnenswert, nämlich die grünviolette Färbung[2]), die die Substanz mit nicht zu konzentrierter warmer Salzsäure an sich gibt. Der entstehende Farbstoff läßt sich mit Amylalkohol oder Äther ausschütteln. Der amylalkoholische Auszug ist grün, der Ätherauszug violett. Beide zeigen einen Absorptionsstreifen, der ungefähr dieselbe Lage wie der Streifen der Orcinreaktion hat. Es handelt sich wahrscheinlich um eine Farbenreaktion der Glucuronsäure mit dem abgespaltenen p-Kresol[3]) analog der mit anderen Phenolen. Die Färbung ist vergänglich, d. h. sie verschwindet bei längerem Kochen.

Es wurde nun der Versuch gemacht, aus der Doppelverbindung von p-Kresolglucuronsäure mit p-Kresolschwefelsäure die erstere zu isolieren. Zu diesem Zwecke wurde das Bariumsalz in heißem Wasser gelöst und noch vor dem Wiederausfallen mit Bleiessig[4]) versetzt, so lange noch ein Niederschlag entstand.

---

[1]) E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 517, 1899.

[2]) A. Kossel (Zeitschr. f. physiol. Chem. 7, 293, 1883) erwähnt bei den Doppelsalzen von Chinäthonsäure mit Phenolglucuronsäure das Auftreten einer blauen Färbung beim Behandeln mit Salzsäure.

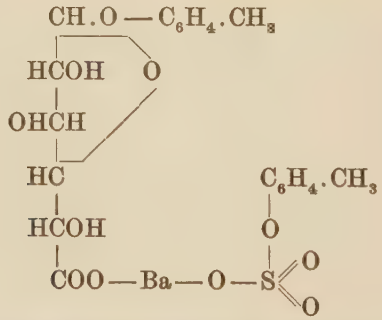
[3]) Sie dürfte in Beziehung stehen zu der von v. Udrański (Zeitschr. f. physiol. Chem. 12, 355, 1888) beobachteten Färbung, die bei Zusatz von H_2SO_4 zu einem Gemische von Furfurol und Kresol auftritt. Auch die α-Naphtholglucuronsäure (M. v. Nencki und M. Lesnik, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 19, 1537, 1886) färbt sich beim Zusatz von H_2SO_4 grün.

[4]) Durch Bleiacetat allein fiel nichts.

Nach 12stündigem Stehen wurde derselbe abgesaugt und reichlich mit kaltem Wasser gewaschen. (Das Waschwasser wurde vernachlässigt.) Die Bleifällung wurde mit kaltem Wasser angerieben und mit Schwefelwasserstoff in der üblichen Weise zersetzt. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde vom Schwefelwasserstoff befreit und mit Bariumcarbonat erwärmt. Die filtrierte und eingedampfte Lösung krystallisierte alsbald. Allein die ausgefallenen Krystalle hatten ganz das Aussehen der obengenannten Doppelverbindung und enthielten neben gebundener Glucuronsäure wiederum gepaarte Schwefelsäure.

Daß trotzdem eine partielle Zerlegung[1]) eintritt, lehrt das Verhalten des Filtrats der Bleiessigfällung. Nach Entbleiung durch Schwefelwasserstoff wurde die Lösung mit einer konzentrierten Kaliumcarbonatlösung bis zur gerade alkalischen Reaktion versetzt. Dabei fiel Bariumcarbonat aus, und das Filtrat davon lieferte beim Eindampfen glucuronsäurefreie Krystalle von typischem p-kresolschwefelsaurem Kalium, das durch Umkristallisieren aus heißem Wasser leicht rein erhalten werden konnte.

Bei dieser festen Vereinigung von p-Kresolschwefelsäure und p-Kresolglucuronsäure, die in dem Bariumdoppelsalz offenbar vorliegt, ist es wohl angebracht, die Verbindung im Sinne der folgenden Formel als gemischtes Bariumsalz beider Säuren zu betrachten:



[1]) Auch durch Überführung in das Brucinsalz gelang keine Zerlegung. Ein Vergleich mit dem als Glucuronsäureverbindung von Phenol oder einem der isomeren Kresole angesprochenen Salz von Wohlgemuth (Zeitschr. f. klin. Med. 56, 407, 1905) war daher unmöglich.

Doppelverbindungen einer gepaarten Glucuronsäure mit Ätherschwefelsäuren sind nun schon bekannt, wenn auch selten beobachtet. A. Kossel[1]) fand 1883, daß Chinäthonsäure (Phenetholglucuronsäure)

$$C_2H_5O.C_6H_4.C_6H_9O_7,$$

das im Harn nach Verfüttern von Phenetol erscheinende Hydrochinonderivat, die Fähigkeit besitzt, mit Ätherschwefelsäuren schwer lösliche Bariumdoppelsalze zu bilden, so mit Kresolätherschwefelsäure sowie mit Indoxylschwefelsäure[2]). Handelt es sich hierbei um die Fähigkeit der p-Kresolätherschwefelsäure zur Doppelsalzbildung mit einer Glucuronsäure, die einen vom p-Kresol verschiedenen Paarling enthält, so zeigt sich in unserm Fall, daß sie sich auch mit p-Kresolglucuronsäure zu einem schön krystallisierenden, schwer löslichen Doppelsalz vereinigt.

Es ist möglich, daß man mit Hilfe von p-Kresolätherschwefelsäure die p-Kresolglucuronsäure wird ausfällen können, ähnlich wie man nach A. Kossel und Hoppe-Seyler (l. c.) die Phenetolglucuronsäure zur Isolierung der Ätherschwefelsäure benutzen kann.

---

[1]) A. Kossel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 7, 292, 1883.

[2]) G. Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 7, 424, 1883.

Die vorstehende Arbeit wurde im Winter 1910 im tierphysiologischen Institut der Kgl. landwirtschaftlichen Hochschule (Geheimrat Prof. Zuntz) begonnen und im Winter 1911 beendet. Die Anregung dazu gab mir Herr Prof. Dr. Carl Neuberg, der Vorsteher der chemischen Abteilung des genannten Instituts, dem ich dafür sowie für die tatkräftige Unterstützung während der Arbeit auch an dieser Stelle meinen besten Dank ausspreche.

Lebenslauf.

Ich, Erich Kretschmer, wurde am 14. Juli 1887 als Sohn des Kaufmanns Carl Kretschmer und seiner Frau Helene geb. Sachs zu Lissa i. P. geboren. Ich bin Jude. Ich besuchte das Königliche Comenius-Gymnasium zu Lissa bis Ostern 1906 und verließ es dann mit dem Zeugnis der Reife, um Chemie zu studieren.

Ich studierte das erste Semester in Freiburg. Darauf genügte ich meiner Militärpflicht von Michaelis 1906 bis Michaelis 1907 beim Königl. bayr. Pionierbataillon Nr. 3 in München, woselbst ich auch immatrikuliert war. Von Oktober 1907 an studierte ich in Berlin.

Das Verbandsexamen bestand ich am 21. Oktober 1909.

Seit dem 1. April 1911 bin ich an der chemischen Abteilung des Königlichen pathologischen Instituts als Assistent beschäftigt.

Ich besuchte die Vorlesungen und Übungen der Herren Professoren:

in Freiburg:

Himstedt, Kiliani;

in München:

v. Baeyer, Paul;

in Berlin:

Biedermann, Börnstein, E. Fischer, F. Fischer, Hertwig, van't Hoff, Marckwald, Meyer, Nernst, Neuberg, Oppenheimer, Riehl, Rosenheim, Wichelhaus.